

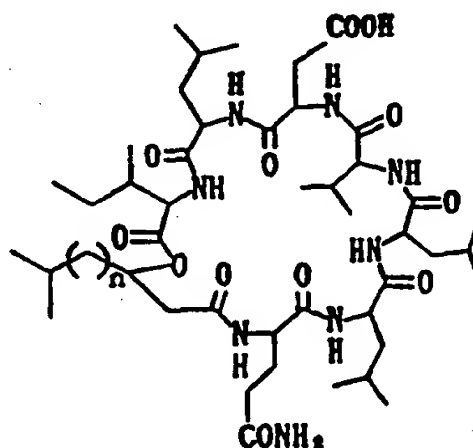


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C07K 7/06, C12P 21/02, A61K 38/08</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO95/32990</p> <p>(43) 国際公開日 1995年12月7日 (07.12.95)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP95/01003</p> <p>(22) 国際出願日 1995年5月25日 (25.05.95)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平6/113023 1994年5月26日 (26.05.94) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日清製粉株式会社 (NISSHIN FLOUR MILLING CO., LTD.) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋小網町19番12号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 平本 茂 (HIRAMOTO, Shigeru) [JP/JP] 斉藤幸男 (SAITO, Yukio) [JP/JP] 畑中繁男 (HATANAKA, Shigoo) [JP/JP] 真貝明子 (SHINGAI, Akiko) [JP/JP] 〒356 埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡5丁目3番1号 日清製粉株式会社 医薬研究所内 Saitama, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 高木千嘉, 外 (TAKAGI, Chiyoshi et al.) 〒102 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル7階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, KR, US, 欧州特許 (DE, FR, GB, IT).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54) Title : CYCLODEPSIPEPTIDE

(54) 発明の名称 環状デプシペプチド

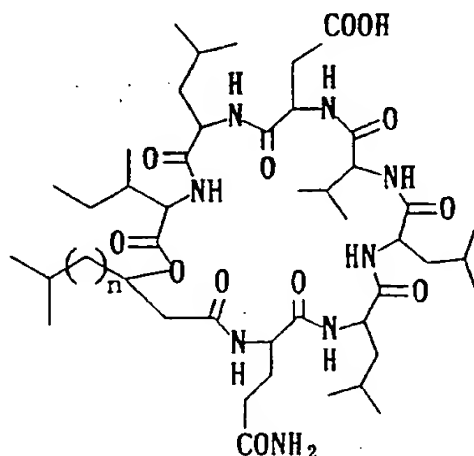


(I)

(57) Abstract

A cyclodepsipeptide represented by general formula (I) or a pharmacologically acceptable salt thereof, wherein n represents an integer of 5 to 15. It is produced by culturing a cyclodepsipeptide-producing bacterium of the genus *Bacillus*, and is useful as a hyperlipemia remedy, lipid secretion inhibitor, and apolipoprotein B production inhibitor.

一般式 (I)



(式中 n は 5 ~ 15 の整数を示す) で表される環状デプシペプチド、またはその薬理学的に許容されうる塩。本化合物は、バシラス属に属する環状デプシペプチド生産菌を培養して製造される。本化合物は高脂血症治療薬、脂質分泌抑制薬、アポリポプロテイン B 産生抑制薬として有用である。

情報としての用途のみ

PCT に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁に PCT 加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SG	シンガポール
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア共和国
BG	ブルガリア	GA	ガボン	MC	モナコ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TD	チャド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IS	アイスランド	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	IT	イタリア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KE	ケニア	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

明 細 書
環 状 デ プ シ ペ プ チ ド

技術分野

本発明は、高脂血症治療薬として利用可能な脂質分泌抑制活性、アポ
5 リポプロテインB産生抑制活性を有する環状デプシペプチド、その製造
法及び用途に関する。

背景技術

高脂血症治療薬に関しては、すでにいくつかの化合物が実用化されて
いる。特に、プラバスタチン、ロバスタチンなどのHMG CoA還元酵素阻
10 害剤は顕著なコレステロール低下作用を有することが報告されており、
これらの薬剤の出現以後、高コレステロール血症の治療が飛躍的に進歩
したと言える。しかしながら、これらの薬剤は血中トリグリセリドは低
下させない。

一方、コレステロールとトリグリセリドの両方を低下させる薬剤とし
15 てはクロフィブレート系薬剤とニコチン酸製剤が実用化されているが、
ニコチン酸では痒み、熱感、発疹などの副作用が高頻度に出現し、クロ
フィブレート系薬剤では胆石の易形成、筋障害、肝機能障害、胃腸障害
などの副作用が問題となっている。また、投与量についてはニコチン酸
製剤であるナイアシンは2～3 gであり、クロフィブラートアルミニウ
20 ムは1.5 g とかなり多いこともまた問題となっている。

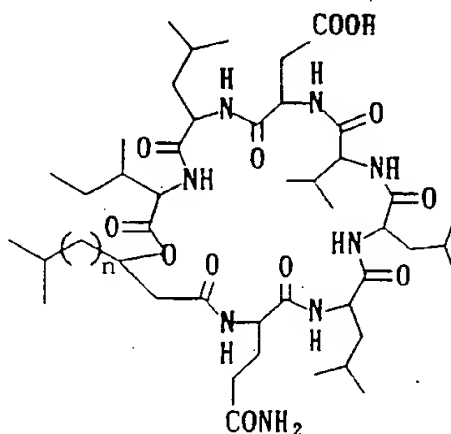
発明の開示

本発明の課題は、高脂血症の治療、予防を効果的に行うために血漿コ
レステロールとトリグリセリドの両方を、従来の薬剤よりも強力に低下
させる化合物の提供である。

25 血漿中のコレステロールとトリグリセリドの大部分は肝臓で合成、分
泌されることから、肝細胞でのコレステロールとトリグリセリドの両方
の分泌を抑制する物質は、血漿コレステロールとトリグリセリドの両方

を低下させる高脂血症治療薬になることが期待される。本発明者らは、肝実質細胞のモデル細胞であるHep G2細胞を用い、この細胞からコレステロールとトリグリセリドの両方の分泌を抑制する化合物を微生物代謝産物に求めて探索した結果、ある種の細菌の培養液に活性成分を見出し、このものが環状デブシペプチド構造を有する化合物であることを見
 5 出した。そして培養液よりこれら環状デブシペプチドを精製単離し、新規化合物であることを明らかにし、さらに研究を重ねた結果、これら環状デブシペプチドが、動脈硬化症の原因とされている超低密度リポタンパク質（Very Low Dencity Lipoprotein; VLDL）の主要な構成タンパク質であるアポリポプロテインBの肝細胞等での産生を抑制し、また肝細胞でのアルブミン等他の蛋白質の合成を妨げずに選択的に脂質分泌を抑制すること等を確認し、本発明を完成するに至った。

本発明によれば、次の構造式（I）



（式中 n は 5 ～ 15 の整数を示す）で表される環状デブシペプチド、およびその薬理学的に許容されうる塩が提供される。上記式中、 n が 6 ～ 12 の整数である化合物が好ましく、特に n が 7、8、9 または 10 である化合物が好ましい。
 25

本発明によればさらにバシラス属に属する上記新規な環状デブシペプチドを生産する菌を培養し、その培養物から環状デブシペプチドを採取

することを特徴とするこれら環状デブシペプチドの製造法が提供される。

- さらに本発明によれば、これら環状デブシペプチド、またはその薬理学的に許容しうる塩を含有してなる医薬組成物、特に高脂血症治療薬、
5 脂質分泌抑制薬またはアポリポプロテインB産生抑制薬が提供される。

本発明の環状デブシペプチドの製造に用いることができる微生物としてはバシラス属に属しこの環状デブシペプチドを生産する菌であればいずれでもよい。例えば北海道小樽市の土壌より分離されたバシラス・エスピー・No. 4691株は使用しうる例として挙げられる。No. 4691株の菌学的性状は下記の通りである。
10

1. 形態学的性質

グラム染色	陽性
大きさ	0.7~1.2×1.5~2.5 μm
形態	桿菌
15 運動性	なし
孢子及び芽胞	あり 楕円形または円柱状 中央

2. 培養的性質

1) 代用肉汁寒天平板培地上での生育

コロニーの形態	周縁は不規則形(R型)であるが、 20 全体としては円形である
色	乳白色から薄い茶褐色
光沢	鈍光で艶がない
拡散性色素	なし

2) 代用肉汁液体培地

25 菌体の沈殿	なし
中間部	濁りなし
表面	菌膜あり

3) その他

30分間の煮沸 耐性

DHL寒天培地 発育せず

デソキシコレート寒天培地 発育せず

5 4) ゼラチン穿刺培養

ゼラチンの液化 なし

5) リトマス・ミルクでの反応

凝固、ペプトン化 あり pHはややアルカリ性

3. 生理学的性質

10 表1に示す。陽性を+、陰性を-とする。

15

20

25

表 1

5	グラム染色性	+	O-Fテスト	ガス
	硝酸塩の還元	+	グルコース	-
			対照	-
	脱窒反応	+	糖から酸及びガスの生成	酸 ガス
	MRテスト	-	L-アラビノース	+
10	VPテスト	+	D-キシロース	-
	インドールの生成	-	D-グルコース	+
			D-マンノース	+
			D-フラクトース	+
			D-ガラクトース	+
15	硫化水素の生成	-	マルトース	+
	デンプンの加水分解	+	シュクロース	+
	クエン酸の利用	+	ラクトース	-
			トレハロース	+
			D-ソルビトール	-
20	無機窒素源		D-マンニトール	+
	硝酸塩	-	イノシトール	-
	アンモニウム塩	+	グリセリン	+
			デンプン	+
			対照	-
25	色素の生成	-	塩化ナトリウムの耐性	0~12%
	ウレアーゼ	-	溶血性	-
	オキシダーゼ	+	アルギニンの分解	+
	カタラーゼ	+	リジンの脱炭酸反応	-
	生育の範囲		オルニチンの脱炭酸反応	-
	温度 最高・最低	15~55℃	マロン酸の利用	+
	pH 最適	6.0~8.0	エスクリンの分解	+
	最高・最低	5.0~10.0		
	酸素に対する態度	好気性		

4. 化学分類学的性質

1) DNAの塩基組成 (GC含量)

50~51%

2) 全菌体加水分解物中のジアミノピメリン酸はmeso型である。

- 5 以上述べた特徴、特に形態観察及び化学分析の結果から、本菌株はバシラス属に属すると考えられた。よって本菌株をバシラス・エスピー・No.4691 (Bacillus sp. No.4691) 株と命名した。なお、No.4691株を通産省工業技術院生命工業技術研究所に寄託申請し、平成6年4月20日、受託番号FERM P-14282号として受託された。また、後日国際寄託へ移
- 10 管申請し、平成7年5月15日、受託番号FERM BP-5101号として国際寄託された。

- 本発明の培養に用いられる培地は、本発明の環状デブシペプチドの生産菌が利用できる任意の栄養源を含有するものであればよい。例えば炭素源として、グリセリン、グルコース、マルトース、シュクロース、デキストリン、でんぷん、油脂類などが使用できる。窒素源として大豆粉、肉エキス、ペプトン、乾燥酵母、酵母エキス、コーンスティープリカーなどの有機物、ならびに硝酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどの無機塩が使用できる。また、必要に応じて食塩、塩化カリウム、炭酸カルシウム、リン酸塩、重金属塩などの無機塩類も添加することができる。
- 15 発酵中の発泡を抑制するために、常法に従って適当な消泡剤、例えばシリコーン、大豆油などを適宜添加することもできる。培養法としては静置培養、振とう培養あるいは通気攪拌培養などを用いることができる。培養温度は20~50℃が適当であるが、25~40℃が好ましい。この方法で
- 20 の本発明の生理活性物質の生産量は振とう培養、通気攪拌培養共に2~4日間で最高に達する。

25 このようにして生産された本発明の環状デブシペプチドは主として菌体中に存在するので、当該物質の採取においては、培養物の遠心分離、

あるいはろ過によって得られた菌体から精製操作をおこなうことが望ましい。精製方法は微生物培養菌体から脂溶性物質を採取するのに通常用いられる方法が適用される。すなわち、菌体にメタノール、エタノール、アセトンなどの水混和有機溶媒を加え、攪拌し抽出液を得る。抽出液の
5 有機溶媒を留去してから酢酸エチルのような水と混和しない有機溶媒で抽出する。抽出に用いられる有機溶媒としては、酢酸エチル、酢酸ブチルのようなエステル類、クロロホルム、塩化メチレンのようなハロゲン化炭化水素類、n-ブタノール、iso-ブタノールのようなアルコール類が挙げられる。

10 このようにして得られた抽出液を、食塩水で洗い、濃縮して得られる粗粉末をシリカゲルのカラムクロマトグラフィーに付す。展開溶媒としては、例えばクロロホルム-メタノール又はヘキサン-酢酸エチルなどの混合溶媒系が用いられ、順次溶媒中メタノール又は酢酸エチルなどの極性溶媒の比率を増していくことにより、他の夾雑物と分離して溶出する
15 ことができる。

このようにして溶出された本発明の環状デブシペプチドを含む区分は、調製用薄層クロマトグラフィー又は高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）などによりさらに精製され、最終的に、本発明の環状デブシペプチドが得られる。

20 また、本発明の環状デブシペプチドは、それ自体公知の方法で、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩等の金属塩、アンモニウム塩、あるいはトリエチルアミン塩等の有機アミンとの塩など、薬理学的に許容されうる塩を形成させることができる。

本発明の環状デブシペプチドまたはその薬理学的に許容し得る塩は種々の投与形態の製剤とする事ができる。すなわち、この製剤は経口的に錠剤、糖衣錠、硬質カプセル剤、軟質カプセル剤、顆粒剤、散剤および
25 溶液、エマルジョンまたは懸濁液のような液剤の形態で投与することが

できる。また、非経口投与の場合には注射液、坐剤の形態で投与される。

これらの製剤の調製にあつたては製剤化のための慣用の添加剤、例えば賦形剤、安定剤、防腐剤、溶解剤、湿潤剤、乳化剤、滑沢剤、甘味剤、
5 着色剤、香味剤、張度調製剤、緩衝剤、酸化防止剤などを添加して製剤化することができる。

添加剤としては、例えばデンプン、白糖、果糖、乳糖、ブドウ糖、マンニトール、ソルビトール沈降性炭酸カルシウム、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ゼラチン、アラビアゴム、
10 ステアリン酸マグネシウム、タルク、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等が挙げられる。

本発明の化合物を液剤、注射剤として用いるときは活性成分を慣用の希釈剤中に溶解または懸濁して用いることができる。希釈剤としては、生理食塩水、リンゲル液、ブドウ糖水溶液、アルコール類、脂肪酸エステル類、グリコール類、グリセリン脂肪酸グリセリド、植物、動物由来
15 の油源、パラフィン類などが含まれる。

また、これらの製剤は、通常の方法で製造することができる。

そして通常の臨床投与量として、成人一人一日当たり経口の場合0.5～5000mgの範囲で用いられる。さらに好ましくは5～500mgの範囲で用
20 いられる。

図面の簡単な説明

図1：本発明の環状デプシペプチド（化合物1）の紫外吸収スペクトルを示す。縦軸は吸光度を、横軸は波長（nm）を示す。

図2：本発明の環状デプシペプチド（化合物1）の赤外吸収スペクトルを示す。縦軸は透過率（％）を、横軸は波数（ cm^{-1} ）を示す。
25

図3：本発明の環状デプシペプチド（化合物1）の ^1H 核磁気共鳴スペクトルを示す。横軸は化学シフト（ppm； δ ）を示す。

実施例

実施例 1. 本発明の環状デブシペプチドの製造

- 可溶性デンプン1.0%、廃糖蜜1.0%、ポリペプトン1.0%、肉エキス1.0%を含む液体培地を500ml容三角フラスコで100mlずつ分注し、常法
- 5 により120℃で20分間滅菌し、これに寒天斜面培地で培養したバシラス・エスピー・No. 4691株を接種し、28℃で48時間回転振とう培養（220回転毎分）して種母培養液とした。可溶性デンプン2.5%、大豆粉1.5%、乾燥酵母0.2%、炭酸カルシウム0.4%を含む液体培地100mlに、この種母培養液 2 mlを接種し、28℃で毎分220回転で3日間振とう培養させた。
- 10 この培養液15リットルを遠心分離し、菌体を得た。菌体にメタノール5リットルを加え、よく攪拌した後、18時間静置した。抽出液をろ過し、得られたろ液は減圧下、メタノールを留去した。得られた水溶液に2 N塩酸を加え、pHを5に調整した。水溶液を酢酸エチル1リットルで3回抽出し、これを飽和食塩水500mlで2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムを
- 15 加え、乾燥させた。酢酸エチル抽出液は減圧濃縮乾固してから少量のクロロホルムに溶解し、シリカゲルをクロロホルムに懸濁して充填したカラム（200ml）にマウントした。クロロホルム300ml、クロロホルム－メタノール（98：2）、クロロホルム－メタノール（95：5）各300mlの順番でカラムを洗浄し、不純物を除いた。次に、カラムをクロロホルム－
- 20 メタノール（80：20）の溶媒系300mlで活性区分を溶出させた。活性区分は減圧濃縮乾固してから、調製用薄層クロマトグラフィー（担体、シリカゲルガラスプレート60F254、0.50mm、独メルク社製）に付し、クロロホルム－メタノール（3：1）で展開した。Rf=0.28を示す活性区分をかきとった後、メタノールで溶出し、溶出液を減圧濃縮乾固した。これ
- 25 を少量のメタノールに溶解し、セファデックスLH20（ファルマシア社製）を充填したカラム（1.6cm直径×60cm高さ）にマウントし、メタノールで溶出をおこない、2.5mlずつ分取した。フラクション18から20番までは

まとめて濃縮乾固して無色結晶を得た。これを化合物 1 とする。

フラクション15から17番までは濃縮乾固後、高性能液体クロマトグラフィー [カラム ; Inertsil ODS (内径20mm, 長さ250mm、GLサイエンス社製)、移動相 ; メタノール : 水 : 酢酸アンモニウム = 95 : 5 : 0.1、流速 5 15ml/分、検知器 UV 222nm] につけ、保持時間15.20分のピークと保持時間18.06分のピークを分取した。それぞれを濃縮乾固し、保持時間15.20分の区分より化合物 2 の白色粉末を、保持時間18.06分の区分より化合物 3 の白色粉末を得た。フラクション21から23番までも同様に濃縮乾固後、高性能液体クロマトグラフィー (条件は上と同じ) につけ、保持時間25.02分のピークを分取した。これを濃縮乾固し、化合物 4 の白色粉末を得た。 10

このようにして得られた本発明の環状デプシペプチドの物理化学的性質は、次に示す通りである。

化合物 1

15 形状 : 無色結晶

融点 : 155~157°C

質量分析 (FABMS) : m/z 1057 (M+Na)

分子式 : $C_{53}H_{94}N_8O_{12}$

紫外吸収スペクトル (MeOH) : 末端吸収 (図 1 参照)

20 赤外吸収スペクトル (KBr錠法による) :

3290, 2958, 2928, 2870, 1750, 1658, 1528, 1468, 1387, 1370, 1260, 1199, 1025, 796 (cm^{-1} 、図 2 参照)

1H 核磁気共鳴スペクトル

(400MHz, ppm, 多重度, Methyl- d_3 alcohol中) :

25 0.79 (6H, d), 0.80 (3H, t), 0.81 (3H, d), 0.82 (3H, d), 0.83 (6H, d), 0.86 (6H, d), 0.87 (3H, d), 0.88 (6H, d), 1.10 (2H, m), 1.20 (16H, m), 1.45 (1H, m), 1.50 (6H, m), 1.54 (2H, m).

1.57 (1H, m), 1.58 (1H, m), 1.63 (1H, m), 1.85 (2H, m), 1.95 (1H, m), 2.12 (1H, m), 2.18 (2H, d-d), 2.35 (1H, d-d), 2.52 (1H, d-d), 2.75 (2H, t), 4.00 (1H, d-d), 4.24 (1H, m), 4.26 (1H, d-d), 4.32 (1H, m), 4.37 (1H, m), 4.42 (1H, m), 4.60 (1H, m), 5.05 (1H, m), 6.76 (1H, bs), 7.50 (1H, bs), 7.75 (1H, d), 7.95 (1H, d), 8.08 (1H, d), 8.12 (1H, d), 8.14 (1H, d), 8.19 (1H, d), 8.24 (1H, d) (図3参照)

¹³C核磁気共鳴スペクトル

(100MHz, ppm, 多重度, Methyl alcohol-d₄中) :

10 11.9 (q), 16.1 (q), 18.5 (q), 19.7 (q), 22.2 (q), 22.2 (q),
22.8 (q), 23.1 (q), 23.1 (q), 23.1 (q), 23.4 (q), 23.4 (q),
25.8 (d), 26.0 (d), 26.0 (d), 26.1 (t), 26.4 (t), 28.5 (t),
29.1 (t), 29.1 (d), 30.3 (t), 30.6 (t), 30.6 (t), 30.7 (t),
30.9 (d), 31.0 (t), 32.7 (t), 35.2 (t), 37.4 (t), 38.4 (d),
15 40.2 (t), 41.2 (t), 41.5 (t), 41.5 (t), 42.0 (t), 52.0 (d),
52.8 (d), 53.4 (d), 53.8 (d), 54.1 (d), 58.3 (d), 61.2 (d),
73.9 (d), 172.2 (s), 172.5 (s), 173.0 (s), 173.3 (s), 173.7 (s),
173.7 (s), 174.8 (s), 175.0 (s), 175.4 (bs), 177.8 (s)

比旋光度

20 $[\alpha]_D^{29} -11.2^\circ$ (c = 0.414, MeOH)

薄層クロマトグラフィー

(担体 : シリカゲルガラスプレート 60F254、0.25mm, 独メルク社製)

	展開溶媒	Rf
	クロロホルム-メタノール (3 : 1)	0.28
25	クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水 (10:4:1)	0.52

化合物 2

形状 : 白色粉末

質量分析 (FABMS) : m/z 1007 (MH)⁺

分子式 : $C_{51}H_{90}N_8O_{12}$

紫外吸収スペクトル (MeOH) : 末端吸収

赤外吸収スペクトル (KBr錠法による) :

5 3320, 2958, 2928, 1740, 1658, 1520, 1439, 1391, 1202 (cm^{-1})

¹H核磁気共鳴スペクトル

(400MHz, ppm, 多重度, Methyl alcohol-d₄中) :

0.79 (6H, d), 0.80 (3H, t), 0.81 (3H, d), 0.82 (3H, d), 0.83
 (6H, d), 0.86 (6H, d), 0.87 (3H, d), 0.88 (6H, d), 1.10 (2H,
 10 m), 1.20 (12H, m), 1.45 (1H, m), 1.50 ~ 1.65 (11H, m), 1.85
 (2H, m), 1.95 (1H, m), 2.12 (1H, m), 2.18 (2H, d-d), 2.35
 (1H, d-d), 2.55 (1H, d-d), 2.78 (2H, d), 4.00 (1H, d), 4.24
 (1H, d-d), 4.26 (1H, d), 4.32 (1H, d-d), 4.37 (1H, d-d), 4.42
 (1H, d-d), 4.60 (1H, d-d), 5.08 (1H, m)

15 薄層クロマトグラフィー

(担体 : シリカゲルガラスプレート 60F254, 0.25mm, 独メルク社製)

展開溶媒	Rf
------	----

クロロホルム-メタノール (3 : 1)	0.28
----------------------	------

クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水 (10:4:1)	0.52
---------------------------------	------

20 高性能液体クロマトグラフィー

カラム : Inertsil ODS (GLサイエンス社製)

移動相 : メタノール : 水 : 酢酸アンモニウム (97 : 3 : 0.1)

流速 : 1.0ml/min、検知器 : UV 222nm、保持時間 : 4.38分

化合物 3

25 形状 : 白色粉末

質量分析 (FABMS) : m/z 1021 (MH)⁺

分子式 : $C_{52}H_{92}N_8O_{12}$

紫外外部吸収スペクトル (MeOH) : 末端吸収

赤外吸収スペクトル (KBr錠法による) :

3330, 2958, 2928, 1736, 1652, 1520, 1456, 1389, 1203 (cm^{-1})

^1H 核磁気共鳴スペクトル

5 (400MHz, ppm, 多重度, Methyl alcohol- d_4 中) :

0.79 (6H, d), 0.80 (3H, t), 0.81 (3H, d), 0.82 (3H, d), 0.83 (6H, d), 0.86 (6H, d), 0.87 (3H, d), 0.88 (6H, d), 1.10 (2H, m), 1.20 (14H, m), 1.45 (1H, m), 1.50 ~ 1.65 (11H, m), 1.85 (2H, m), 1.95 (1H, m), 2.13 (1H, m), 2.18 (2H, d-d), 2.38 (1H, d-d), 2.52 (1H, d-d), 2.68 (1H, d-d), 2.73 (1H, d-d), 4.05 (1H, d), 4.25 (1H, d-d), 4.27 (1H, d-d), 4.32 (1H, d-d), 4.35 (1H, d-d), 4.42 (1H, d-d), 4.60 (1H, d-d), 5.08 (1H, m)

薄層クロマトグラフィー

(担体: シリカゲルガラスプレート 60F254, 0.25mm, 独メルク社製)

15	展開溶媒	Rf
	クロロホルム-メタノール (3 : 1)	0.28
	クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水 (10:4:1)	0.52

高性能液体クロマトグラフィー

カラム: Inertsil ODS (GLサイエンス社製)

20 移動相: メタノール: 水: 酢酸アンモニウム (97 : 3 : 0.1)

流速: 1.0ml/min、検知器: UV 222nm、保持時間: 4.68分

化合物 4

形状 : 白色粉末

質量分析 (FABMS) : m/z 1049 (MH) $^+$

25 分子式 : $\text{C}_{54}\text{H}_{96}\text{N}_8\text{O}_{12}$

紫外外部吸収スペクトル (MeOH) : 末端吸収

赤外吸収スペクトル (KBr錠法による) :

3310, 2958, 2928, 1745, 1658, 1525, 1440, 1391, 1202 (cm^{-1})

^1H 核磁気共鳴スペクトル

(400MHz, ppm, 多重度, Methyl alcohol- d_4 中)

0.79 (6H, d), 0.80 (3H, t), 0.81 (3H, d), 0.82 (3H, d), 0.83
 5 (6H, d), 0.86 (6H, d), 0.87 (3H, d), 0.88 (6H, d), 1.10 (2H,
 m), 1.20 (18H, m), 1.45 (1H, m), 1.50 ~ 1.65 (11H, m), 1.85
 (2H, m), 1.95 (1H, m), 2.12 (1H, m), 2.18 (2H, d-d), 2.35
 (1H, d-d), 2.53 (1H, d-d), 2.75 (2H, d), 4.00 (1H, d), 4.24
 (1H, d-d), 4.26 (1H, d), 4.32 (1H, d-d), 4.37 (1H, d-d), 4.42
 10 (1H, d-d), 4.60 (1H, d-d), 5.04 (1H, m)

薄層クロマトグラフィー

(担体: シリカゲルガラスプレート 60F254, 0.25mm, 独メルク社製)

	展開溶媒	Rf
	クロロホルム-メタノール (3 : 1)	0.28
15	クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水 (10:4:1)	0.52

高性能液体クロマトグラフィー

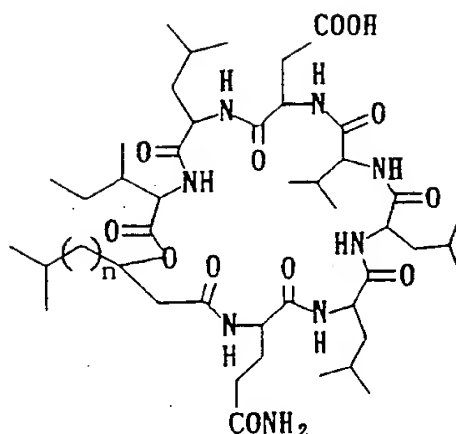
カラム: Inertsil ODS (GLサイエンス社製)

移動相: メタノール: 水: 酢酸アンモニウム (97 : 3 : 0.1)

流速: 1.0ml/min、検知器: UV 222nm、保持時間: 5.40分

20 以上の結果より、化合物 1 ~ 4 の構造は以下に示されるとおりである。

5



10

$n = 7$ 化合物 2

$n = 8$ 化合物 3

$n = 9$ 化合物 1

$n = 10$ 化合物 4

(薬理作用)

15

性

20

試験例 1 : 本発明の環状デブシペプチドのコレステロール分泌抑制活性

25

Hep G2細胞 1×10^5 個/ml (10% 牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (日水製薬社製 ; 以後、D-MEM 培地と呼ぶ) を 24 穴組織培養用プレートに 1 ml ずつ注入し、37℃、炭酸ガス 5% および空気 95% の混合ガス雰囲気下で培養した。4 日後に、培地を除去し、10% リボ蛋白欠損血清 (シグマ社製) を含む D-MEM 培地 1 ml を加え、さらに、この環状デブシペプチドのメタノール溶液 $10 \mu\text{l}$ を加えた。18 時間後、培地を再び交換 (10% リボ蛋白欠損血清を含む D-MEM 培地) し、この環状デブシペプチドのメタノール溶液 $10 \mu\text{l}$ と $[1-^{14}\text{C}]$ 酢酸 $3 \mu\text{Ci}$ を加え、さらに 37℃ で 18 時間培養した。培地中に生成した $[^{14}\text{C}]$ コレステロールは「*バイオキミカ エト バイオフィジカ アクタ (Biochimica et Biophysica Acta)*」1042 巻、36~41 頁 (1990) の方法に従って定量した。

すなわち、培地をクロロホルム/メタノール (2 : 1) で抽出し、つ

いで抽出物を15%水酸化カリウム中85℃、45分間の条件でケン化反応を行い、エステル型コレステロールを遊離型コレステロールとした。コレステロールを石油エーテルで抽出し、これをシリカゲル薄層クロマトグラフィに付し、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸(80:20:1)で展開した。コレステロールのスポットをかきとり、液体シンチレーションカウンターによって、放射活性を測定し、これを [^{14}C] コレステロール量とした。

また、試験例1において環状デブシペプチドのメタノール溶液のかわりにメタノールを用いた以外は同様に行い測定し、コントロールとした。さらにコントロールの [^{14}C] コレステロール量を100としてコレステロール相対量を計算した。

本発明の環状デブシペプチドの各濃度におけるコレステロール分泌に及ぼす影響を表2に示す。

表 2

本発明の環状デブシペプチドのコレステロール分泌に及ぼす影響

化合物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	コレステロール相対量 (%)
1	0.1	83
1	0.3	73
1	0.9	47
1	2.7	28
1	8.1	23
2	8.1	41
3	8.1	44
4	8.1	17

試験例2：本発明の環状デブシペプチドのトリグリセリド分泌抑制活性

Hep G2細胞 1×10^5 個/ml (10%牛胎児血清を含むD-MEM培地) を24穴

組織培養用プレートに1 mlずつ注入し、37℃、炭酸ガス5 %および空気95 %の混合ガス雰囲気下で培養した。4 日後に、培地を除去し、10 %リポ蛋白欠損血清(シグマ社製)を含むD-MEM培地1 mlを加え、さらに、新規環状デブシペプチドのメタノール溶液10 μ lを加えた。18時間後、培地を再び交換(10 %リポ蛋白欠損血清を含むD-MEM培地)し、新規環状デブシペプチドのメタノール溶液10 μ lと〔2-³H〕グリセロール3 μ Ciを加え、さらに37℃で18時間培養した。培地中に生成した〔³H〕トリグリセリドは〔「バイオキミカ エト バイオフィジカ アクタ(Biochimica et Biophysica Acta)」1170巻、32~37頁(1993)〕の方法により定量した。

すなわち、培地をヘキサン/イソプロパノール(3 : 2)によって抽出し、これをシリカゲル薄層クロマトグラフィーに付し、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸(90 : 10 : 1)で展開した。トリグリセリドのスポットをかきとり、液体シンチレーションカウンターによって、放射活性を測定し、これを〔³H〕トリグリセリド量とした。

また、試験例2の環状デブシペプチドのメタノール溶液のかわりにメタノールを用いて同様に行い測定し、コントロールとした。さらにコントロールの〔³H〕トリグリセリド量を100としてトリグリセリド相対量を求めた。

本発明の環状デブシペプチドの各濃度におけるトリグリセリド分泌に及ぼす影響を表3に示す。

表 3

本発明の環状デブシペプチドのトリグリセリド分泌に及ぼす影響

化合物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	トリグリセリド相対量 (%)
1	2.7	84
5 1	8.1	51
2	8.1	77
3	8.1	86
4	8.1	75

10 以上表 2 および表 3 の結果より本発明の環状デブシペプチドは濃度依存的に肝細胞のコレステロールおよびトリグリセリドの分泌を抑制することが示された。

試験例 3 : 本発明の環状デブシペプチドの Hep G 2 細胞でのアポリポ蛋白 B とアルブミン産生に与える影響

15 Hep G2細胞 1×10^5 個/ml (10%牛胎児血清を含むD-MEM培地) を24穴組織培養用プレートに1 mlずつ注入し、37°Cで炭酸ガス5%および空気95%の混合ガス雰囲気下で培養した。4日後に、培地を除去し、10%リポ蛋白欠損血清 (シグマ社製) を含むD-MEM培地1 mlを加え、さらに環状デブシペプチドのメタノール溶液10 μl を加えた。18時間後、培地を再び交換 (10%リポ蛋白欠損血清を含むD-MEM培地) し、環状デブシペ

20 プチドのメタノール溶液10 μl を加え、さらに37°Cで18時間培養した。培地中に生成したアポリポ蛋白 B とアルブミンはエンザイムイムノアッセイ法によって定量した。以下に各蛋白質の定量法を記載する。

1) アポリポ蛋白 B の定量

25 本方法で使用した緩衝液の組成を表 4 に示す。なお、PBSとはリン酸緩衝液を、PBS-TはTween20を添加したリン酸緩衝液を示す。

表 4

緩衝液の組成

	PBS(pH7.2)		PBS-T(pH7.2)		ブロッキング液(pH7.2)
	KH ₂ PO ₄ 0.2g		KH ₂ PO ₄ 0.2g		Block Ace 250ml
5	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 2.9g		Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 2.9g		KH ₂ PO ₄ 0.2g
	NaCl 8.0g		NaCl 8.0g		Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 2.9g
	KCl 0.2g		KCl 0.2g		NaCl 8.0g
			Tween 20 0.5g		KCl 0.2g

*緩衝液は蒸留水を加えて、合計1000mlになるように調製する。

- 10 ヒツジ抗ヒトアポリポプロテインB IgG分画（バインディングサイト社製）を0.05M炭酸水素ナトリウム（pH9.5）に10 μ g/mlになるように溶解した。この50 μ lをメンクイムノプレートに分注し、4℃で16時間静置した。

- 15 PBS 300 μ lで3回洗浄後、ブロッキング液300 μ lを加え、37℃で2時間静置した。再びPBS 300 μ lで3回洗浄し、サンプル溶液50 μ l（Hep G2培地を10%の乳タンパク質由来の免疫用ブロック剤（Block Ace；大日本製薬社製）で3.3倍希釈したもの）を加え、室温で2時間放置した。PBS-T 300 μ lで3回洗浄後、ヒツジ抗ヒトアポリポプロテインB ペルオキシダーゼ標識体（バインディングサイト社製）の0.5%溶液（10% Block Ace）50 μ lを加え、室温で2時間放置した。PBS-T 300 μ lで20 5回洗浄し、発色液（0.1Mクエン酸カリウムpH4.5 1ml, 30%過酸化水素水0.4 μ l, オルトフェニレンジアミン1mg）100 μ lを加え、そのまま2分間放置した。2-N硫酸100 μ lを加え反応を止め、490nmの吸光度と650nmの吸光度の差を求め、これをアポリポプロテインBの吸光度とした。試験例3において、環状デプシペプチドのメタノール溶液のかわりにメタノールを用いた以外は同様に行い測定し、コントロールとした。25 低密度リポ蛋白（シグマ社製）を標準品とした場合の検量線よりアポリ

ポプロテイン B の絶対量を求め、各サンプルの相対アポリポプロテイン B 量はこれとコントロールの比率 $\times 100\%$ で表した。

2) アルブミンの定量

アポリポプロテイン B と同じ方法によって定量した。ただし、ヒツジ抗ヒトアポリポプロテイン B IgG 分画（バインディングサイト社製）のかわりにヒツジ抗ヒトアルブミン IgG 分画（バインディングサイト社製）を使用し、ヒツジ抗ヒトアポリポプロテイン B ペルオキシダーゼ標識体のかわりにヒツジ抗ヒトアルブミンペルオキシダーゼ標識体を使用した。また、サンプル溶液は Hep G2 培地を 10% Block Ace で 13.3 倍希釈したもの

5 抗ヒトアポリポプロテイン B IgG 分画（バインディングサイト社製）の
 かわりにヒツジ抗ヒトアルブミン IgG 分画（バインディングサイト社製）
 を使用し、ヒツジ抗ヒトアポリポプロテイン B ペルオキシダーゼ標識体
 のかわりにヒツジ抗ヒトアルブミンペルオキシダーゼ標識体を使用し
 た。また、サンプル溶液は Hep G2 培地を 10% Block Ace で 13.3 倍希釈し
 10 たものを $50 \mu\text{l}$ 加えた。検量線作成時の標準品としては、ヒトアルブミ
 ン（シグマ社製）を使用した。サンプルの相対アルブミン量はコントロ
 ール

ールのアルブミンの絶対量を 100 とした際の比率（%）として求めた。

本発明の環状デプシペプチドの各濃度におけるアポリポプロテイン B とアルブミン産生に及ぼす影響を表 5 に示す。

15

表 5

本発明の環状デプシペプチドのアポリポプロテイン B
およびアルブミン産生に及ぼす影響

化合物	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	アポリポプロテイン B 相対量 (%)	アルブミン相対量 (%)
1	12.5	48	99
1	25.0	24	106

20

以上表 5 の結果より、本発明の環状デプシペプチドが Hep G2 細胞において、アルブミンの産生に影響を及ぼさずに、アポリポプロテイン B の産生を選択的に抑制することが示された。

25

以上の結果より、本発明の環状デプシペプチドは、Hep G2 細胞のコレステロールとトリグリセリドの分泌を低濃度で強力に抑制し、さらにはアポリポプロテイン B の産生も抑制するが、アルブミン等の他の蛋白質

の分泌を抑制しないことから、選択性の高い、新しいタイプの高脂血症治療薬としての利用が期待される。

(製剤例)

製剤例 1 錠剤 (1 錠)

5	化合物 1	20 mg
	けい酸マグネシウム	20 mg
	乳糖	98.5 mg
	ヒドロキシプロピルセルロース	7.5 mg
	ステアリン酸マグネシウム	1 mg
10	植物硬化油	3 mg
	計	150 mg

化合物 1、けい酸マグネシウム及び乳糖を混合し、これをヒドロキシプロピルセルロースを溶解したアルコール液で練合し、次いで適当な粒度に造粒し、乾燥、整粒後さらにステアリン酸マグネシウム及び植物硬化油を添加混合し均一な顆粒とする。次いでロータリー式打錠機により直径 7.0mm、重量 150mg および硬度 6 kg の錠剤を調製した。

製剤例 2 顆粒剤

	化合物 1	10 mg
	酸化マグネシウム	40 mg
20	りん酸水素カルシウム	38 mg
	乳糖	10 mg
	ヒドロキシプロピルセルロース	20 mg

上記処方例中ヒドロキシプロピルセルロースを除いた各原料を均一に混合し、これにヒドロキシプロピルセルロースを溶解したアルコール溶液を加えて練合した後押出造粒機により造粒し、乾燥して顆粒を得た。この顆粒を整粒して 12 メッシュの篩を通過し 48 メッシュの篩上に残留するものを顆粒剤とした。

製剤例 3 シロップ剤

	化合物 1	1.000 g
	白糖	30.000 g
	D-ソルビトール 70 w/v %	25.000 g
5	パラオキシ安息香酸エチル	0.030 g
	パラオキシ安息香酸プロピル	0.015 g
	香料	0.200 g
	グリセリン	0.150 g
	96%エタノール	0.500 g
10	精製水	適量
	全量	100 ml

- 白糖、D-ソルビトール、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピル及び化合物 1 を精製水（温水）60 g に溶解する。冷却後香料を溶解したグリセリン及びエタノールの溶液を加える。次にこの
- 15 混合物に精製水を加えて 100 ml にする。

製剤例 4 注射液

	化合物 1 ナトリウム塩	10.0 mg
	塩化ナトリウム	81.0 mg
	炭酸水素ナトリウム	8.40 mg
20	注射用蒸留水	適量
	全量	10.0 ml

炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム及びこの化合物 1 のナトリウム塩を蒸留水に加えて溶解し、全量を 10.0 ml とする。

製剤例 5 坐剤

25	化合物 1	2 g
	ポリエチレングリコール 4000	20 g
	グリセリン	78 g

全量 100 g

化合物 1 にグリセリンを加えて溶解する。そこへ、ポリエチレングリコール 4000 を加えて加温し溶解後、坐剤型に注入して冷却固化し 1 個あたり 1.5 g の坐剤を製造する。

5 産業上の利用可能性

本発明により提供される環状デブシペプチド (I) は、高脂血症治療薬、特に脂質分泌抑制剤およびアポリポプロテイン B 産性抑制剤として有用である。本発明の化合物はバシラス属に属する本化合物の生産菌を培養することにより製造される。

10

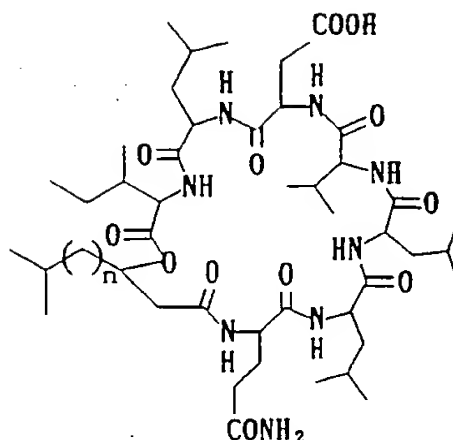
15

20

25

請 求 の 範 囲

1. 構造式 (I)



(式中 n は 5 ～ 15 の整数を示す) で表される環状デブシペプチドおよびその薬理学的に許容されうる塩。

2. n が 6 ～ 12 の整数である請求項 1 記載の環状デブシペプチドおよびその薬理学的に許容されうる塩。

3. n が 7、8、9 または 10 である請求項 1 記載の環状デブシペプチドおよびその薬理学的に許容されうる塩。

4. バシラス属に属する請求項 1 記載の環状デブシペプチドの生産菌を培養し、その培養物から生産された環状デブシペプチドを採取することを特徴とする環状デブシペプチドの製造法。

5. 請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかの項に記載の環状デブシペプチド、またはその薬理学的に許容されうる塩を含有してなる医薬組成物。

6. 請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかの項に記載の環状デブシペプチド、またはその薬理学的に許容されうる塩を含有してなる高脂血症治療薬。

7. 請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかの項に記載の環状デブシペプチド、またはその薬理学的に許容されうる塩を含有してなる脂質分泌抑制薬。

8. 請求項 1 乃至請求項 3 のいずれかの項に記載の環状デプシペプチド、
またはその薬理学的に許容される塩を含有してなるアポリポプロテイン B 産生抑制薬。

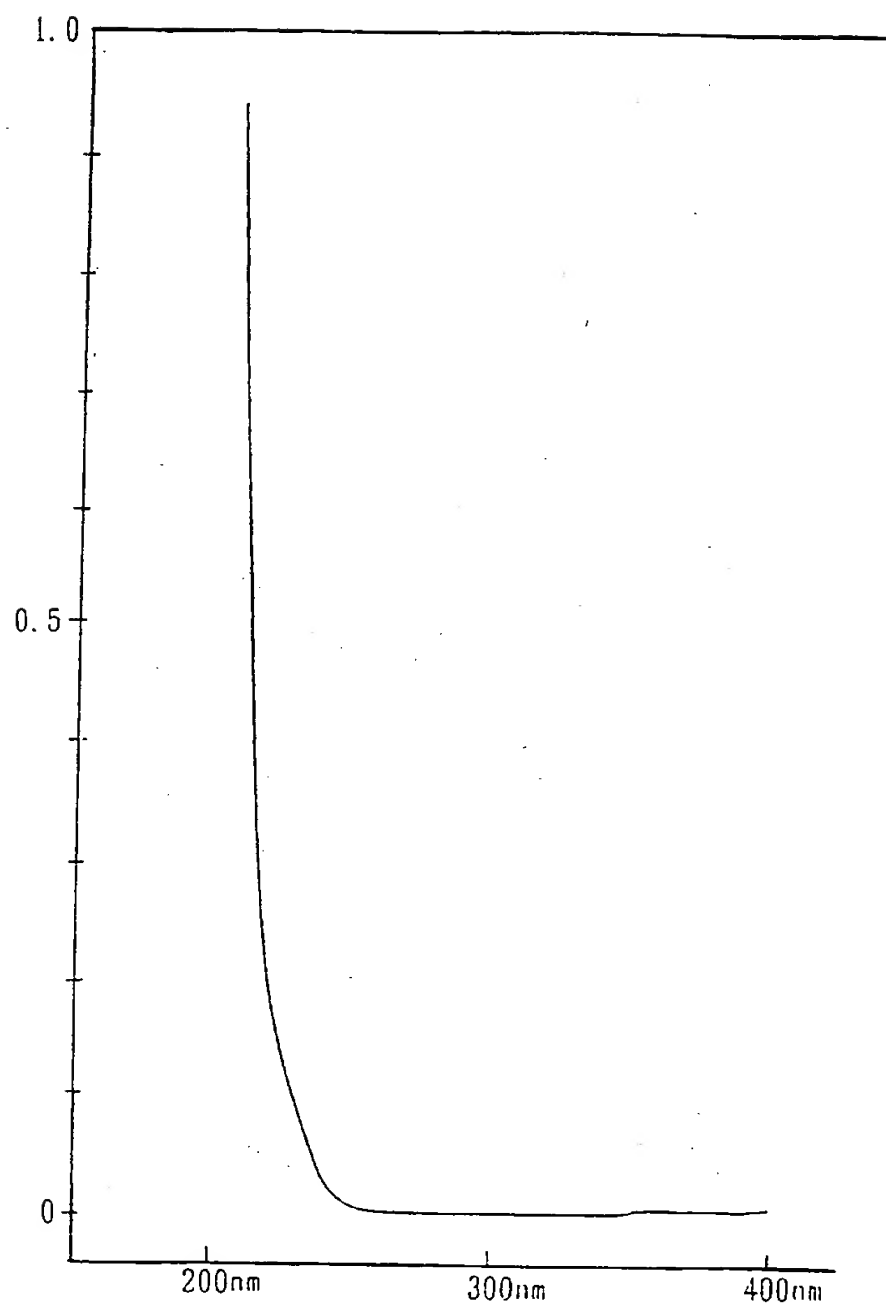
5

10

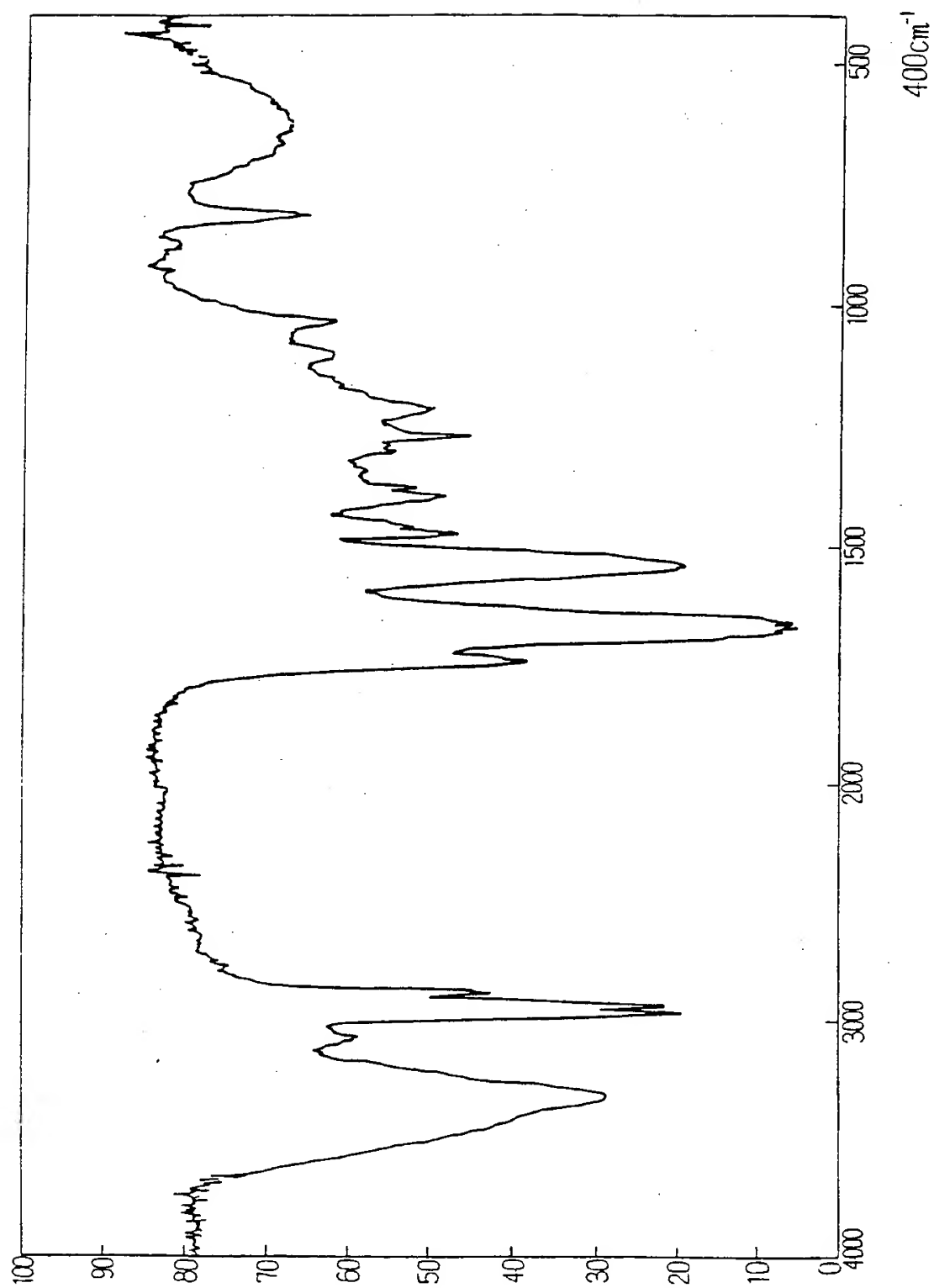
15

20

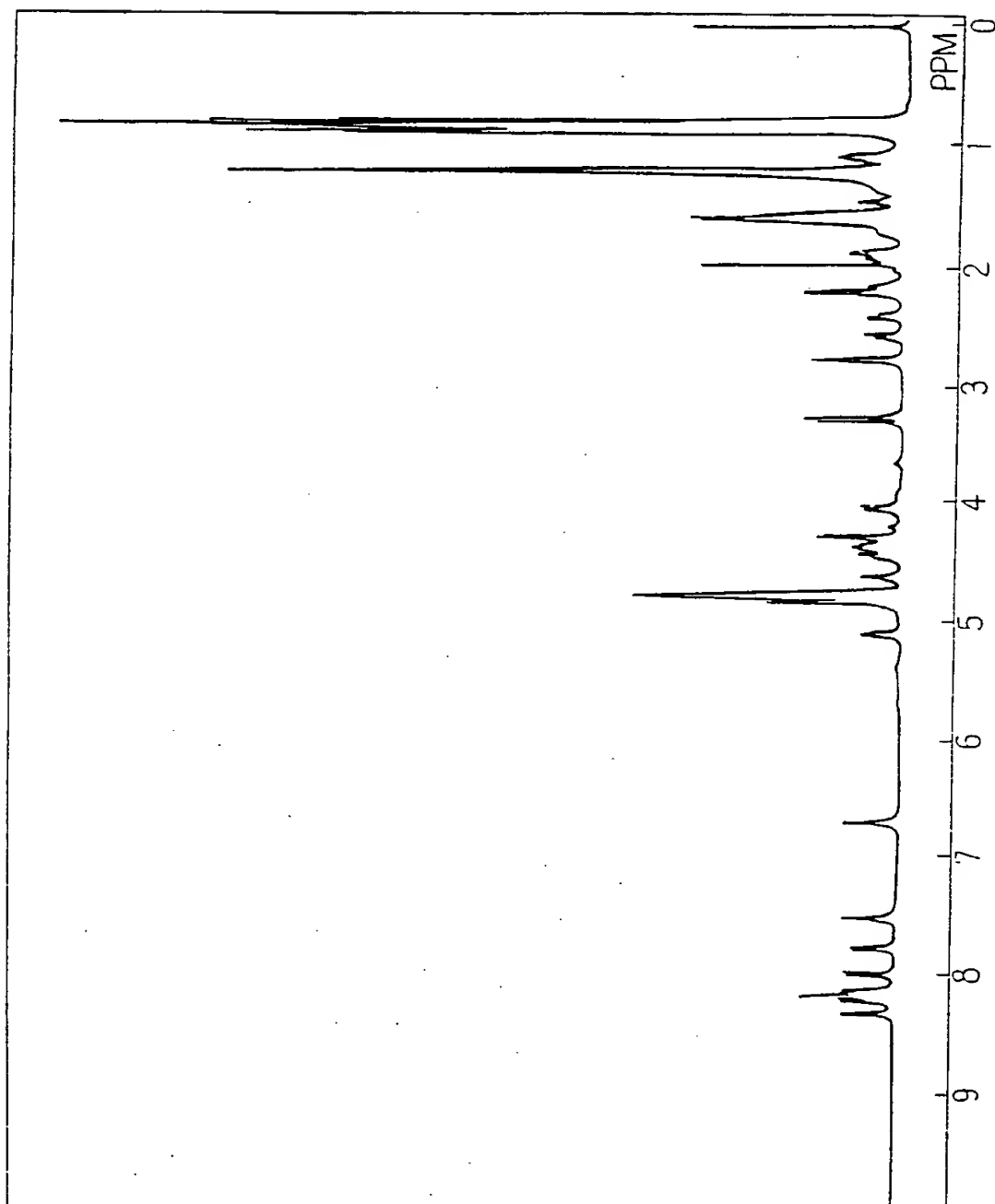
25



第 1 図



第 2 図



第 3 図

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C07K7/06, C12P21/02, A61K38/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C07K7/06, C12P21/02, A61K38/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	The Journal of Antibiotics. Vol. 37, No. 10, (1984) p. 1257-1259; Koko Sugawara et al. "BMY-28160, A New Peptide Antibiotic"	1 - 8
A	JP, 60-21998, B2 (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), May 30, 1985 (30. 05. 85) (Family: none)	1 - 8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

August 11, 1995 (11. 08. 95)

Date of mailing of the international search report

August 29, 1995 (29. 08. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C07K7/06, C12P21/02, A61K38/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C07K7/06, C12P21/02, A61K38/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	The Journal of Antibiotics, Vol.37, No.10, (1984) p.1257-1259; KoKo Sugawara et al. "BMY-28160, A New Peptide Antibiotic"	1-8
A	JP, 60-21998, B2 (工業技術院長), 30.5月.1985(30.05.85) (ファミリーなし)	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.08.95

国際調査報告の発送日

29.08.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4 B 9 2 8 2

電話番号 03-3581-1101 内線

3449